

Aus der Hautklinik der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. H. W. Spier

Isolierung und Charakterisierung von m-RNS aus tierischer Epidermis

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Reinhard Knop
aus Berlin

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548818_0066

Aus der Hautklinik der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. H. W. Spier

Isolierung und Charakterisierung von m-RNS aus tierischer Epidermis

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Reinhard Knop
aus Berlin

Referent : Professor Dr. E. Schwarz

Koreferent: Professor Dr. med. Neubert

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26. Januar 1976



MEINER MUTTER

GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	6
2. <u>Material und Methoden</u>	9
2.1. <u>Material</u>	9
2.1.1. Substanzen	9
2.1.2. Puffer	9
2.1.3. Tiere	10
2.2. <u>Methoden</u>	11
2.2.1. Präparation der Haut und mechanische Separierung der Epidermis vom Corium	11
2.2.2. Präparation von Polysomen	11
2.2.2.1. Präparation von Polysomen im Schwingbecherrotor	11
2.2.2.2. Präparation von Polysomen im Festwinkelrotor	12
2.2.3. Analysen der Polysomen	13
2.2.3.1. Sedimentationsanalyse der Polysomen durch Zonen-zentrifugation	13
2.2.3.2. Aktivitätstest der Polysomen	13
2.2.3.3. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Polysomen	13
2.2.4. Pulsmarkierung der Polysomen	14
2.2.5. Phenolextraktion von Ribonukleinsäuren aus Polysomen	14
2.2.6. Messung der Radioaktivität von Polysomen und Ribonukleinsäuren	15
2.2.7. Sedimentationsanalyse der Ribonukleinsäuren durch Zonen-zentrifugation	15

	<u>Seite</u>
2.2.8. Test der phenolextrahierten Ribonukleinsäuren auf poly-A-Sequenzen	16
2.2.9. Freisetzung und Sedimentationsanalyse von Messenger-Ribonukleinsäuren aus Polysomen durch Puromycinbehandlung	16
3. <u>Ergebnisse</u>	18
3.1. <u>Qualitativer Nachweis von Polysomen im linearen Saccharosedichtegradienten</u>	18
3.2. <u>Präparation von Polysomen aus Meerschweinleber und Hammellymphknoten im Schwingbecherrotor und Untersuchung abfallender Detergenzkonzentrationen auf Ausbeute und Qualität der Polysomen</u>	18
3.3. <u>Präparation und Analyse von Polysomen aus Epidermis</u>	20
3.3.1. Isolierung von Polysomen aus Epidermis im Schwingbecherrotor - Unterschiede zwischen jungen und alten Meerschweinen	20
3.3.2. Präparation von Polysomen aus Epidermis im Festwinkelrotor	21
3.4. <u>Isolierung von Polysomen aus Epidermis ohne Detergenz im Homogenisationspuffer</u>	22
3.5. <u>Abhängigkeit der Ausbeute und Qualität der Polysomen von der Mg^{++}-Konzentration im Lösungspuffer B</u>	23

	<u>Seite</u>
3.6. <u>Prüfung der Polysomen auf ihre</u> <u>Empfindlichkeit gegenüber Ribo-</u> <u>nuklease</u>	24
3.7. <u>Pulsmarkierung der Polysomen</u>	25
3.8. <u>Aktivitätstest der Polysomen</u>	26
3.9. <u>Elektronenmikroskopische Untersu-</u> <u>chung der Polysomen</u>	27
3.10. <u>Ribonukleinsäureextraktion aus Po-</u> <u>lysomenpellets von Epidermiszellen</u> <u>mit Phenol</u>	28
3.11. <u>Sedimentationsanalyse der Ribonuklein-</u> <u>säuren aus Polysomen</u>	28
3.12. <u>Dissoziation von Polysomen in intakte</u> <u>Untereinheiten zur Freisetzung von</u> <u>m-RNS</u>	30
3.13 <u>Test auf poly-A-Sequenzen</u>	33
4. <u>Diskussion</u>	36
4.1. <u>Polysomenisolierung und Polysomenana-</u> <u>lyse</u>	36
4.2. <u>Isolierung und Analyse von pulsmar-</u> <u>kierter r-RNS und m-RNS aus Poly-</u> <u>somen</u>	40
4.3. <u>Test der m-RNS auf poly-A-Sequenzen</u>	44
4.4. <u>Dissoziation von Polysomen zur Frei-</u> <u>setzung von m-RNS</u>	46
5. <u>Zusammenfassung</u>	48
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	49

1. EINLEITUNG

Messenger-Ribonukleinsäuren aus zahlreichen Eukaryontenzellen sind bisher untersucht und isoliert worden (11). Die Proteinsynthese in diesen Zellen wurde weitgehend aufgeklärt (47).

Die Translation wurde einerseits an Zellen wie Leberzellen, Ganglienzellen oder Zellen aus Zellkulturen mit vielfältigen Stoffwechselleistungen untersucht, andererseits an Zellen, die nur wenige Proteine bilden. Zellen, die nur wenige Proteine synthetisieren, lassen auch nur wenige dafür spezifische Messenger-Ribonukleinsäuren als Matrizen für die Proteinsynthese vermuten (11). Als Beispiele dienen m-RNS-Isolierungen aus Zellen der Augenlinse (45), den Retikulozyten (49, 72), den Muskelzellen (37), den Spinnrüsen der Seidenraupe (16, 71). Das Ziel der Untersuchung über Translationsvorgänge gipfelt im Einsatz von gewonnenen Matrizenmolekülen in zellfreie Proteinsynthesysteme und in der Analyse der in vitro synthetisierten Proteine. Isolierte Messenger-Ribonukleinsäuren aus Augenlinsen (60), aus Muskelzellen (37), aus Retikulozyten (44) sind erfolgreich in Proteinbiosynthesysteme eingesetzt worden.

Als besondere Funktion der Epidermis ist die Keratinisation, d.h. die Transformation lebender Epithelzellen in Hornmaterial anzuse-

nen. Sie beinhaltet u.a. die Synthese spezieller Skleroproteine (Keratine) mit zwei Schwerpunkten. Der erste liegt in den basalen Zellschichten, der Regenerationszone, der zweite in den oberen kernhaltigen Zellschichten, insbesondere dem Str. granulosum. Diese speziellen Epidermisproteine sind nicht nur durch eine unterschiedliche Aminosäuresequenz, sondern auch durch eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung ausgezeichnet (4, 6, 7, 17-20, 28-32, 34, 46, 57, 58, 64).

Da die Produktion besonderer Proteine auch besondere Matrizen voraussetzt, wie Untersuchungen an seidenfibroinsynthetisierenden Zellen (16, 71) und hämoglobinsynthetisierenden Retikulozyten (49, 72) mit den entsprechenden Messenger-Ribonukleinsäuren zeigen, erwarteten wir charakteristische Messenger-Ribonukleinsäuren auch in Epidermiszellen.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich ausführlich mit der Isolierung und Charakterisierung von Polysomen aus Epidermis, der zweite Teil mit der Isolierung und Charakterisierung von m-RNS aus Polysomen der Epidermis. Bei Beginn der Arbeit lagen drei Untersuchungen über Polysomen aus Epidermis vor, die den RNase-Reichtum der Epidermiszellen als größtes Hindernis für ihre Untersuchungen darstellten (26, 40, 70). Da die zu untersuchenden m-RNS-Moleküle sehr

RNase-empfindlich sind, mußten diese Schwierigkeiten überwunden werden. Die Darstellung von aktiven Polysomen und von Messenger-Ribonukleinsäuren sollte dem späteren Einsatz in Proteinbiosynthesystemen dienen.

Da die Skleroproteine der Epidermis wegen ihrer relativen Unlöslichkeit nur ungenügend untersucht werden konnten (65), könnte die Untersuchung von in vitro synthetisierten Vorstufen eine Möglichkeit zur Strukturaufklärung bieten. Genauere Kenntnisse über die Kontrollen und Proteinsynthesewege in der Epidermis sind für die Untersuchung von pathologischen Prozessen in diesem Gewebe wichtig (35).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1. Substanzen

von der Firma Merck bezogen: NaCl, KCl,
MgCl₂, Triäthanolamin, EDTA-Titriplex III,
Phenol, Äther, Saccharose

von der Firma E. Arden bezogen: Enthaa-
rungswachs

von der Firma Serva bezogen: SDS

von der Firma Boehringer bezogen: Puromycin,
Rinderpankreasribonuklease

von der Firma Packard bezogen: Triton X-100

von der Firma New England Nuclear bezogen:
Adenin (2-³H) (5-15 ci/mmol), Uridin (5,6-³H)
(40-50 ci/mmol), Aquasol

von der Firma Miles Laboratories, Inc. be-
zogen: poly(³H)-Uridylsäure (61,9 uci/μmol P)

2.1.2. Puffer

Puffer A (Homogenisationspuffer):

250 mM Saccharose
100 mM Tris-HCl pH 8,5
200 mM KCl
5 mM MgCl₂
0,25 mM EDTA
1%ig an Triton X-100

Puffer B (Lösungspuffer):

50 mM Tris-HCl pH 7,5
25 mM KCl
5 mM MgCl₂
0,25 mM EDTA

Puffer B₁: 50 mM Tris-HCl pH 7,5
25 mM KCl
2 mM MgCl₂
0,25 mM EDTA
Puffer B₂: 50 mM Tris-HCl pH 7,5
25 mM KCl
0 mM MgCl₂
0,25 mM EDTA
Puffer C: 150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA
Puffer D: 1000 mM KCl
100 mM Tris-HCl pH 7,5
5 mM MgCl₂
Puffer E: 500 mM KCl
50 mM Tris-HCl pH 7,5
5 mM MgCl₂

2.1.3. Tiere

Albinomeerschweine der Tierfarm Bäumler
in Wolfratshausen

Jungtiere: bis 3 Wochen alt, bis 200 g schwer

Alttiere: älter als 3 Wochen, schwerer als
200 g

2.2. METHODEN

2.2.1. Präparation der Haut und mechanische Separierung der Epidermis vom Corium (66)

Die Meerschweine wurden durch Nackenschlag und Ausbluten nach Eröffnung der Halsschlagader getötet. Das abgezogene Fell wurde mittels Wachs (50 - 60° C.) enthaart und die Epidermis mit einem Skalpell vom Corium durch Schaben separiert.

2.2.2. Präparation von Polysomen

2.2.2.1. Präparation der Polysomen im Schwingbecherrotor (22, 69)

Die isolierte Epidermis wurde sofort in Puffer A (1 g: 2,5 ml, 0 - 4° C.) aufgenommen und in einem gekühlten Glasteflonhomogenisator mit 5 - 7 Strokes homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 10.000 g und 0° C. im SS 34-Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge RC 2-B zentrifugiert. Der Überstand (postmitochondrialer Überstand = PMÜ) wurde mittels einer Fritte der Größe Nr. 3 abgenutscht, um in der Lösung befindliche restliche Haare, Wachs und den größten Teil des in der Kälte ausgefallenen Fettes zurückzuhalten. Der so grob gereinigte PMÜ wurde über einen Stufengradienten geschichtet, der aus 1,7 M und 1,0 M Saccharose in Puffer B bestand ("Saccharosekissen") und in der Beckman-Ultrazentrifuge L2 65B im SW27-Rotor mit 27.000 Upm 16 Stunden bei 2° C. zentrifugiert.

Der Überstand und die Saccharosestufen wurden mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit Aqua bidest zweimal gewaschen und je nach folgender Untersuchung in Aqua bidest oder Puffer B, B₁, B₂ gelöst.

Die Polysomenlösung wurde im SS34-Rotor bei 10.000 g zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu sedimentieren. Aus dem Überstand wurde ein Aliquot entnommen und im Zeiss-Spektralphotometer PMQII die Extinktion von 220 - 300 nm schrittweise bestimmt.

Die Quotienten $\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{\text{lin.}}}$ und $\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{280 \text{ nm}}}$ dienten als Maß der Reinheit der Präparation.

Dabei sollte das Verhältnis $\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{\text{lin.}}}$ den Wert 1,4* und $\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{280 \text{ nm}}}$ den Wert 1,7 erreichen (50).

10 E_{280 nm} Einheiten (OD_{280 nm}/ml bei 1 cm Lichtweg) entsprechen 1 mg Ribosomen (2, 50, 61).

2.2.2.2. Präparation von Polysomen im Festwinkelrotor

Die Epidermis wurde, wie oben beschrieben, isoliert, bis zum HMÜ aufgearbeitet, der auf ein 0,6 M Saccharosekissen geschichtet und im Ti60-Rotor in der Beckman-Ultrazentrifuge bei 60.000 Upm, 60 Minuten, 2° C. zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde zweimal mit Aqua bidest gewaschen und in Lösungspuffer oder Aqua bidest gelöst.

* persönliche Erfahrung

2.2.3. Analysen der Polysomen

2.2.3.1. Sedimentationsanalyse der Polysomen durch Zonenzentrifugation

Die im Schwingbecher- oder Festwinkelrotor gewonnenen Polysomen wurden auf einen nach (15, 50) hergestellten linearen Rohruckergradienten von 20 - 45 % aufgetragen und im SW27-Rotor bei 27.000 Upm, 0° C, 5 Stunden aufgetrennt. Der Inhalt wurde über eine Hohnadel, die in den Gradienten bis auf den Röhrchenboden eingeführt war, abgesaugt und im Durchfluß bei 252 nm im LKB Uvicord II gemessen und mit einem Kompensationsschreiber der Firma Texas Instr.Inc. registriert. Fraktionen à 0,5 bis 1,0 ml wurden im LKB Ultrorac Fraktionssammler gesammelt.

2.2.3.2. Aktivitätstest der Polysomen

Es wurde die Fähigkeit der Polysomen aus Epidermis geprüft, unter günstigen Bedingungen im zellfreien Proteinbiosynthesesystem Polypeptide zu synthetisieren. Benutzt wurde das für die Polysomen der Hefe optimierte System zur zellfreien Proteinsynthese (62, 63): Ein Inkubationsansatz von 2 ml enthielt 50 - 150 OD_{260 nm} Polysomen, ca. 0,4 mg Enzymfraktion einschließlich t-RNS, AA-t-RNS-Synthetase und Faktoren*, 40 mM KCL,

*Für Überlassung danke ich B. Schulz-Harder.

6 mM $MgCl_2$, 1,5 mM ATP, 0,03 mM GTP, 3 mM PEP-Kinase und 10 uci (^{14}C)-Phenylalanin (100 ci/mol). Die Inkubation erfolgte bei 30° C 80 Minuten lang. Alle 5 Minuten wurden 100 ul Proben aus dem Inkubationsansatz entnommen, mit Trichlor-essigsäure versetzt und im Wasserbad 10 Minuten bei 100° C erhitzt. Die Proben wurden auf Filterpapier verteilt und mit Alkohol/Äther gewaschen. Die am Filterpapier anhaftende Radioaktivität wurde durch Szintillationszählung im Beckman-Szintillationszähler erfasst und als Maß der synthetisierten Proteine gewertet. Gleiche Ansätze ohne Einsatz von Polysomen zeigten lediglich Radioaktivitätswerte im Bereich des O-Lffektes.

1.2.3.3. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Polysomen

Polysomenpellets aus Epidermis wurden im Elmiskop Ia elektronenoptisch untersucht.*

*Für die Untersuchung danke ich Frau Galich.

2.2.4. Pulsmarkierung der Polysomen

Für einen Versuchsansatz wurden in der Regel 3 Meerschweinchen je 100 uci (^3H)-Adenin oder (^3H)-Uridin in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung in 5 bis 6 Quaddeln intradermal (Rückenhaut) verabfolgt. Die Laufzeiten betrugen 25 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten und 24 Stunden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte, wie unter 2.2.1. bis 2.2.2. beschrieben.

2.2.5. Phenolextraktion von Ribonukleinsäuren aus Polysomen (14)

Die durch präparative Zentrifugation isolierten Polysomen wurden in Aqua bidest bis zu einer Konzentration von 100 OD/ml gelöst, mit 0,1 Volumen 5%igen SDS und 0,1 Volumen 1 M Tris-HCl pH 9,0 versetzt. Diese Lösung wurde mit der gleichen Menge redestillierten, wassergesättigten Phenols bei 0 bis 4° C. 5 Minuten gemischt. Anschließend wurde die Suspension durch Zentrifugation im HB4-Rotor in der Sorvall-Kühlzentrifuge mit 10.000 Upm in 3 Phasen getrennt, eine wässrige Phase, eine Interphase und eine Phenolphase. Die wässrige Phase wurde abgenommen, und die Phenol- und Interphase wurden mit 1 Volumen 0,1 M Tris-HCl pH 9 erneut gemischt und wie oben getrennt. Die beiden wässrigen Phasen wurden vereinigt und noch dreimal phenolisiert, um Protein und SDS zu entfernen.

Das nach der letzten Zentrifugation verbliebene Phenol in der wässrigen Phase wurde mit Äther im Überschuß ausgeschüttelt und restlicher Äther mit Preßluft ausgeblasen. Durch Zugabe von 2,5 Volumen von Äthanol abs. und 0,1 Volumen 1 M NaCl-Lösung wurden die Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase in der Kälte gefällt. Der Niederschlag wurde im SS34-Rotor in der Sorvall-Kühlzentrifuge bei 10.000 Upm sedimentiert, die alkoholische Lösung verworfen und der Niederschlag im Luftstrom getrocknet. Die sedimentierten Nukleinsäuren wurden in Puffer C gelöst, ein Spektrum von 220 bis 300 nm aufgenommen und die Reinheit der Präparation anhand der Quotienten $\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{230 \text{ nm}}}$, $\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{280 \text{ nm}}}$ beurteilt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde durch die Extinktion bei 260 nm berechnet.

2.2.6. Messung der Radioaktivität von Polysomen und Ribonukleinsäuren

Die Radioaktivitätsmessung wurde im Packard Tri Carb Flüssigkeitsszintillationsspektrometer im Tritiumkanal mit Aquasol als Szintillator durchgeführt. 500 ul der Probe wurden mit 10 ml Aquasol und 3 ml Aqua bidest versetzt und bis zur Entstehung eines Gels geschüttelt, das eine stets gleiche Geometrie bei der Messung gewährleistete.

2.2.7. Sedimentationsanalyse der Ribonukleinsäuren durch Zonenzentrifugation

Die phenolextrahierten Ribonukleinsäuren

wurden in den Mengen von 400 bis 800 gamma auf lineare 7 bis 40%ige Rohrzuckergradienten geschichtet und in der Beckman-Ultrazentrifuge L2 65B bei 27.000 Upm, 0° C. im SW27-Rotor 16 Stunden zentrifugiert. Die Gradienten wurden durch Anstich von oben kontinuierlich ausgetropft, in Einzelproben fraktioniert, die Transmission bei 252 nm wie unter 2.2.3. registriert. Die Radioaktivität jeder Probe wurde wie unter 2.2.6. gemessen und die jeweilige Impulsrate der ihr entsprechenden optischen Registrierung zugeordnet.

2.2.8. Test der phenolextrahierten Ribonukleinsäuren auf poly-A-Sequenzen (24)

400 gamma phenolextrahierte Ribonukleinsäuren aus Polysomen wurden in Puffer C gelöst und mit steigenden Mengen ³H-Polyuridylat versetzt und 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Inkubate wurden im linearen Rohrzuckerdichtegradienten von 7 bis 40 % 16 Stunden lang im SW27-Rotor bei 0° C. zentrifugiert und die Transmission und Radioaktivität, wie oben beschrieben, gemessen.

2.2.9. Freisetzung und Sedimentationsanalyse von Messenger-Ribonukleinsäuren aus Polysomen durch Puromycinbehandlung (8, 9, 10)

Pulsmarkierte Polysomen wurden zu einer möglichst hohen Konzentration (bis 200 OD/ml)

in Aqua bidest gelöst. 200 ul der Polyso-
menlösung wurden mit 250 ul Puffer D und
50 ul einer 10 mM Puromycinlösung versetzt.
Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 0° C. und
10 Minuten bei 37° C. inkubiert und auf
einen linearen 7 bis 40%igen Saccharose-
gradienten geschichtet, der mit Puffer E
bereitet war. Der Gradient wurde in der
Beckman-Ultrazentrifuge L2 65B im SW27-Ro-
tor bei 27.000 Upm, 20° C. 7 Stunden, 20
Minuten zentrifugiert und, wie oben beschrie-
ben, analysiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Qualitativer Nachweis von Polysomen aus Epidermis durch Auftrennung von PMÜ im linearen Saccharosedichtegradienten

Aus Epidermishomogenat junger und alter Meerschweine wurde durch Zentrifugation ein PMÜ hergestellt. Ein Aliquot dieses PMÜ wurde auf lineare Rohrzuckergradienten geschichtet und analysiert. Der PMÜ junger Meerschweine ergab drei unscharfe Polysomenpeaks und einen hohen Monoribosomenpeak (s. Abb. 1).

Abb. 1 Polysomen aus Epidermis junger Meerschweine; 1 ml PMÜ auf 15 - 40%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 4 Std., 2° C.

Bei der Analyse des PMÜ von alten Meerschweinchen deuteten sich Polysomen nur schulterartig an (s. Abb. 2).

Abb. 2 Polysomen aus Epidermis alter Meerschweine; 1 ml PMÜ auf 15 - 34%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 4 Std., 2° C.

3.2. Präparation von Polysomen aus Meerschweinleber und Hammellymphknoten im Schwingbecherrotor und Untersuchung abfallender Detergenzkonzentrationen auf Ausbeute und Qualität der Polysomen

Die Präparation von Polysomen aus Leberzellen

erfolgte, wie unter 2.2.2.1. beschrieben. Aus 1 g Leber ließen sich 1,1 mg Polysomen (in Puffer B gelöst) isolieren. Die Reinheitskontrolle ergab:

$$\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{235 \text{ nm}}} = 1,5 \quad \text{und} \quad \frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{280 \text{ nm}}} = 1,8$$

Die Analyse eines Aliquots im linearen Rohrzuckerdichtegradienten von 20 - 45 % (Puffer B) ergab folgende Aufteilung (s. Abb. 3):

Die Polysomen sedimentierten bergförmig mit einer Auftrennung in 5 Peaks, die 80s-Ribosomen traten relativ zurück im Profil.

Abb. 3 1,2 mg Polysomen aus Meerschweinleber auf 20 - 45%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

Die Präparation von Polysomen aus Hammellymphozyten erfolgte, wie unter 2.2.2.1. beschrieben, aber der Homogenisationspuffer A enthielt 1 %, 0,5 %, 0,25 % Triton X-100.

Detergenzkonzentration in Puffer A	Ausbeute an Polysomen in mg/g Frischgew.	$\frac{E_{260\text{nm}}}{E_{235\text{nm}}}$	$\frac{E_{260\text{nm}}}{E_{280\text{nm}}}$
1 % Triton X-100	1,34	1,5	1,8
0,5 % Triton X-100	1,40	1,46	1,77
0,25% Triton X-100	1,30	1,46	1,77

Alle Polysomen wurden in Puffer B gelöst.

Bei der Analyse der Polysomen, die mit 1 % (s. Abb. 4), 0,5 % (s. Abb. 5), 0,25 % Triton X-100

(s. Abb. 6) in Puffer A präpariert waren, konnte kein Unterschied zwischen den Präparationen festgestellt werden, die Ausbeuten und Reinheitsquotienten zeigten ebenfalls keine Unterschiede. Die Abbildungen 4, 5, 6 zeigen jeweils einen hohen Monoribosomenpeak, 5 Polysomenpeaks und am schweren Ende des Gradienten nicht mehr auftrennbare langkettige Polysomen.

Abb. 4 1,5 mg Polysomen aus Hammellymphozyten (1 % Triton X-100 in Puffer A) auf 20 - 45%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

Abb. 5 1,5 mg Polysomen aus Hammellymphozyten (0,5 % Triton X-100 in Puffer A)

Abb. 6 1,5 mg Polysomen aus Hammellymphozyten (0,25 % Triton X-100 in Puffer A)

3.3. Präparation und Analyse von Polysomen aus Epidermis

3.3.1. Isolierung von Polysomen aus Epidermis im Schwingbecherrotor - Unterschiede zwischen jungen und alten Meerschweinchen

Ribosomales Material junger Meerschwein-Epidermis (s. Abb. 7) ließ sich in 5 Polysomen- und 1 relativ hohen Monoribosomenpeak auftrennen, während das alter Tiere (s. Abb. 8)

nur 2 relativ unscharfe und 2 scharfe Polysomenpeaks und den hohen Monosomenpeak aufwies.

Abb. 7 1,4 mg Polysomen aus Epidermis junger Meerschweine auf 20 - 45%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

Abb. 8 1,2 mg Polysomen aus Epidermis alter Meerschweine auf 20 - 45%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

Die Pelletierung der Polysomen aus PMÜ durch einen Stufengradienten ergab längerkettiges ribosomales Material, das sich scharf auftrennen ließ, während Polysomenanalysen aus PMÜ (s. Abb. 1 + 2) nur eine geringe und unscharfe Trennung zuließen. Vergleiche von den Abbildungen 7, 8 mit den Abbildungen 3, 4, 5, 6 zeigen, daß in Analysen von Polysomen aus Epidermis und Lymphozyten der Monosomenanteil relativ hoch ist gegenüber den Polysomenpeaks, während die Polysomen aus Leberzellen die Monosomenfraktion überwiegen.

3.3.2. Präparation von Polysomen aus Epidermis im Festwinkelrotor

Bei der Gewinnung von Polysomen im Festwinkelrotor Ti60 betrug die Ausbeute 0,20 mg Ribosomen pro g Epidermis, wenn das Pellet in Fuiffer B gelöst wurde.

Die Quotienten lauteten

$$\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{235 \text{ nm}}} = 1,7 \quad \text{und} \quad \frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{280 \text{ nm}}} = 2,0.$$

Abbildung 9 zeigt die Analyse von Polysomen aus Epidermis alter Meerschweine, die im Festwinkelrotor durch ein Rohrzuckerkissen pelletiert wurden. Es lassen sich 5 Polysomenfraktionen von einem hohen Monoribosomen-peak abgrenzen. Ein Vergleich mit der Analyse von Polysomen, die im Schwingbecherrotor präpariert waren (s. Abb. 8), läßt den Schluß zu, daß beide Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern.

Abb. 9 1,4 mg Polysomen aus Epidermis alter Meerschweine auf 20 - 45%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

3.4.

Isolierung von Polysomen aus Epidermis ohne Detergenz im Homogenisationspuffer

Fehlte bei der Aufarbeitung das Detergenz Triton X-100 im Homogenisationspuffer, lag die durchschnittliche Ausbeute nur bei 0,009 mg Ribosomen pro g Epidermis. Folgende Quotienten wurden berechnet:

$$\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{240 \text{ nm}}} = 1,2 \quad \text{und} \quad \frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{280 \text{ nm}}} = 1,57.$$

Wegen der geringen Ausbeute konnte keine analytische Zentrifugation angeschlossen werden.

3.5. Abhängigkeit der Ausbeute und Qualität der Polysomen aus Epidermis von der Mg^{++} -Konzentration in Lösungspuffer B

Es ließ sich zeigen, daß die Löslichkeit der Polysomen mit fallender Mg^{++} -Konzentration im Lösungsmittel zunimmt.

Mg^{++} -Konzentration im Lösungspuffer	Ausbeute an Polysomen in mg/g Frischgew.	$\frac{E_{260nm}}{E_{min.}}$	$\frac{E_{260nm}}{E_{280nm}}$
5 mM (B)	0,17-0,2	1,57	1,8
2 mM (B ₁)	1,3	1,4	1,8
0 mM (B ₂)	1,6	1,55	1,8

Die Analyse von Polysomen, die in Puffer B (s. Abb. 7, 8) gelöst waren, wurde unter 3.3.1. beschrieben. Abbildung 10 zeigt Polysomen, die in Puffer B₁ gelöst waren. Die Saccharose für den analytischen Gradienten war ebenfalls in Puffer B₁ gelöst. Neben 2. polysomalen Schultern und dem hohen Monoribosomenpeak treten eine Schulter aus 60s-Untereinheiten und ein 40s-Untereinheitenpeak auf.

Abb.10 1,2 mg Polysomen aus Epidermis alter Meerschweine in Puffer B₁ (2 mM $MgCl_2$) gelöst und in 20 - 45%igem linearen Saccharosegradienten analysiert; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

Wurden die Polysomen in Mg^{++} -freiem Puffer B_2 gelöst und analysiert, dissoziierten sie vollständig in 60s- und 40s-Untereinheiten (s. Abb. 11).

Abb. 11 Durch Dissoziation von Polysomen aus Meerschwein-Epidermis entstanden 40s- und 60s-Untereinheiten; 1,5 mg Polysomen in Puffer B_2 (Mg^{++} -frei) gelöst und in 20 - 45%igem linearen Saccharosegradienten analysiert; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

3.6. Prüfung der Polysomen aus Epidermis auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Pankreasribonuklease

Zum Beweis, daß es sich bei dem präparierten Material um Polysomen handelte, wurde die Empfindlichkeit gegenüber Ribonuklease A geprüft (50). 1,4 mg Ribosomen in 1 ml Puffer B wurden mit 0,1 µg Pankreasribonuklease versetzt. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 25° C. inkubiert und im analytischen Dichtegradienten von 20 - 45%iger Saccharose 5 Stunden bei 2° C. zentrifugiert (s. Abb. 13). Parallel wurde der gleiche Ansatz ohne Ribonuklease analysiert (s. Abb. 12). Das Polysomenprofil erwies sich als Ribonuklease-sensibel. Damit ist der Verdacht beseitigt worden, daß das polysomale Profil durch aggregierende Ribosomen vorge-täuscht wurde.

Abb. 12 1,4 mg Polysomen aus Epidermis alter Meerschweine auf 20 - 45%igem linearem Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

Abb. 13 1,4 mg Polysomen aus Epidermis alter Meerschweine mit 0,1 µg Ribonuklease A 5 Min. bei 25° C. inkubiert; Analyse in 20 - 45%igem linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

3.7. Pulsmarkierung der Polysomen

Für jeden Versuchsansatz wurden 3 Meerschweine je 100 uci (³H)-Adenin oder (³H)-Uridin mit einer Laufzeit von 25 Min., 60 Min., 120 Min. und 24 Std. verabfolgt. Die Polysomen wurden nach den oben beschriebenen Methoden isoliert und im analytischen Dichtegradienten sedimentiert. Bei einer Laufzeit von 60 Minuten (s. Abb. 14) ergab die Transmission bei 252 nm ein polysomales Profil. Die Verteilung der Radioaktivität entspricht nicht dem optischen Profil. Entsprechend der kurzen Laufzeit war mit vornehmlicher Markierung der m-RNS zu rechnen. In der Tat steigt die Radioaktivität zum schweren Bereich des Gradienten hin an entsprechend dem m-RNS-Anteil der langkettigen Polysomen. Der Radioaktivitätspeak im leichten Bereich des Gradienten (< 80s) dürfte nicht ribosomal gebundenem m-RNS oder Bruchstücken derselben entsprechen.

Abb. 14 3 Tiere mit je 100 uci (^3H)-Uridin
markiert: Laufzeit 60 Min.; 1,2 mg
Polysomen aus Epidermis junger Meer-
schweine auf 20 - 45%igen linearen
Saccharosegradienten; SW27,
27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

Bei einer Laufzeit von 24 Stunden entspricht
das optische Profil dem in Abbildung 14. Die
Radioaktivität verteilt sich entsprechend der
Transmission (s. Abb. 15). Nach 24 Stunden
scheint nur noch ribosomale RNS markiert zu
sein. Bei einer Langzeitmarkierung war mit
einer vornehmlichen r-RNS-Markierung zu
rechnen. In der Tat entspricht das Radioak-
tivitätsprofil dem optischen Profil.

Abb. 15 3 Tiere mit je 100 uci (^3H)-Uridin
markiert; Laufzeit 24 Stunden. 1,4 mg
Polysomen aus Epidermis junger Meer-
schweine auf 20 - 45%igen linearen
Saccharosegradienten; SW27,
27.000 Upm, 5 Std., 2° C.

3.8.

Aktivitätstest der Polysomen aus Epidermis
im zellfreien Proteinbiosynthesystem

Die nach 2.2.3.2. gemessene Radioaktivität
zeigte nach Abzug der Leerwerte eine Zu-
nahme in Abhängigkeit von der Inkubations-
dauer, sodaß auf eine Proteinbiosynthese-
aktivität der

eingesetzten Polysomen geschlossen werden kann.

Abb. 16 Aktivitätstest der Polysomen aus
Meerschweinepidermis

3.9. Elektronenmikroskopische Untersuchung der
Polysomen

Ein im Schwingbecherrotor präpariertes Polysomenpellet wurde mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxyd fixiert, in Mikropal eingebettet und mit Uranylacetat kontrastiert. Die Schnitte wurden im Elmiskop Ia der Firma Siemens untersucht (s. Abb. 17, 18). In den Abbildungen 17 und 18 können Polysomenketten, bestehend aus zwei bis acht Einheiten, erkannt werden.

Abb. 17 Schnitt von einem Polysomenpellet
aus Meerschweinepidermis; Vergrö-
ßerung: 60.000fach

Abb. 18 Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 17

3.10. Ribonukleinsäureextraktion aus Polysomen-
pellets von Epidermiszellen mit Phenol

Aus 1 mg Ribosomen ließen sich 0,24 mg RNS
isolieren. Die Ausbeute, bezogen auf 1 g
Epidermis, betrug 0,32 mg RNS. Das Spektrum,
von 220 - 300 nm gemessen, hatte bei 230 nm
das Minimum und bei 260 nm das Maximum.
Die Quotienten $\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{230 \text{ nm}}}$ und $\frac{E_{260 \text{ nm}}}{E_{280 \text{ nm}}}$ lagen
stets über 2,1.

3.11. Sedimentationsanalyse der Ribonukleinsäuren
aus Polysomen

Wurden die Ribonukleinsäuren, wie im Metho-
denteil beschrieben, isoliert und im Rohr-
zuckerdichtegradienten analysiert, zeigten
sie 3 Banden, denen Sedimentationskoeffizien-
ten von 28s, 18s, 5s entsprechen müßten. Als
geeigneter Rohrzuckergradient erwies sich ein
7 - 40%iger, da bei 7 - 30%iger Saccharose
Ribonukleinsäuren sedimentierten. Wurde den
Tieren (^3H)-Adenin intradermal in die Rücken-
haut gespritzt, zeigte sich nach einer Lauf-
zeit von 25 Minuten in der Sedimentationsana-
lyse eine Verteilung der Radioaktivität über
den ganzen Gradienten, die für m-RNS-Markierung

typisch ist. Bei der relativ kurzen Laufzeit, zeigte sich auch m-RNS $> 28s$, die offenbar radioaktiv markiert wurde (s. Abb. 19).

Abb. 19 1 Meerschwein mit 100 uci (3H)-Adenin markiert; Laufzeit 25 Min.; 800 gamma RNS aus Epidermispoly-somen auf 7 - 40%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 16 Std., 0° C.

Mit zunehmender Laufzeit von 60 Minuten (s. Abb. 20) und 120 Minuten (s. Abb. 21) nimmt die schwerer als 28s sedimentierende Radioaktivität anscheinend zugunsten der im Bereich von 10s bis 4s liegenden Radioaktivität ab. Bei einer Laufzeit von 120 Minuten scheint die Markierung der m-RNS und der r-RNS im Gleichgewicht zu sein.

Abb. 20 3 Meerschweine mit je 100 uci (3H)-Adenin markiert; Laufzeit 60 Min.; 600 gamma RNS aus Epidermispoly-somen auf 7 - 40%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 16 Std., 0° C.

Abb. 21 2 Meerschweine mit je 100 uci (3H)-Adenin markiert; Laufzeit 120 Min.; 550 gamma RNS aus Epidermispoly-somen auf 7 - 40%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 16 Std., 0° C.

Bei einer Laufzeit von 24 Stunden ist eigentlich nur noch mit einer Markierung der r-RNS zu rechnen. In der Tat besteht eine Korrelation zwischen dem Transmissionsprofil und dem Radioaktivitätsprofil (s. Abb. 22).

Abb. 22 3 Meerschweine je 100 uci (^3H)-Adenin markiert; Laufzeit 24 Std.; 800 gamma RNS aus Epidermispolyomen auf 7 - 40%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 16 Std., 0° C.

3.12. Dissoziation von Polysomen in intakte Untereinheiten zur Freisetzung von m-RNS

Die Polysomen wurden in Aqua bidest gelöst und mit der gleichen Menge Puffer B versetzt, so daß die KCl-Konzentration 0,5 M/l betrug. Der Ansatz wurde bei 0° C. und 37° C. inkubiert. und im SW27-Rotor bei 27.000 Upm, 20° C. 5 Stunden in einem 10 - 50%igen linearen Saccharosegradienten analysiert. Wie Abbildung 23 zeigt, sind die Polysomen nicht vollständig bei der hohen KCl-Konzentration dissoziiert.

Abb. 23 1,6 mg Polysomen aus Meerschwein-epidermis in Puffer D gelöst; Analyse im 10 - 50%igen linearen Saccharosegradienten (Puffer E); SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 20° C.

Wurde zum obigen Ansatz eine 10 mM Puromycinlösung zugesetzt, dissoziierten die Monoribo-

somen bis auf eine Schulter in unversehrte 60s- und 40s-Untereinheiten (s. Abb. 24). Am leichten Ende des Gradienten befindet sich das bei 252 nm absorbierende Puromycin.

Abb. 24 1,6 mg Polysomen aus Meerschwein-epidermis in Puffer D gelöst und mit 10 mM Puromycin inkubiert; Analyse im 10 - 50%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 5 Std., 20° C.

Betrug die Laufzeit der mit (³H)-Uridin markierten Epidermis 60 Minuten, zeigten die mit hoher KCl-Konzentration und Puromycin inkubierten Polysomen folgendes Radioaktivitätsprofil: Um den Bereich von 80s liegende Radioaktivität, die Ribosomen und Ribonukleoproteinen entspricht, sowie markierte r-RNS in 60 und 40s-Untereinheiten; im leichteren Bereich <40s findet sich eine Radioaktivität, die von mindestens 35s bis zur Gradientenoberfläche reicht (s. Abb. 25).

Abb. 25 3 Tiere mit je 100 uci (³H)-Uridin markiert; Laufzeit 60 Min.; 5,5 mg Polysomen aus Meerschweinepidermis in Puffer D gelöst und mit 10 mM Puromycin inkubiert; Analyse im 7 - 40%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 7 Std., 20 Min., 20° C.

Nach einer Laufzeit von 120 Minuten (s. Abb. 26) war die r-RNS in der 80s-Ribosomenschulter und den 60 und 40s-Untereinheiten noch intensiver markiert. Nicht zur r-RNS gehörende Aktivität sedimentierte wie in Abbildung 25 von der Gradientenspitze bis zum abfallenden Schenkel der 40s-Untereinheit. Die Gesamtradioaktivitätsmenge in diesem Bereich ist anscheinend geringer geworden.

Abb. 26 3 Tiere mit je 100 uci (^3H)-Uridin markiert; Laufzeit 120 Min.; 3 mg Polysomen aus Meerschweinepidermis in Puffer D gelöst und mit 10 mM Puromycin inkubiert; Analyse im 7 - 40%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 7 Std., 20 Min., 20° C.

Durch Behandlung mit 0,6 ug Rinderpankreas-ribonuklease konnten der 80s-Monoribosomenpeak und die Untereinheiten klar gegenüber sich schnell markierenden RNase-empfindlichen Molekülen herausgearbeitet werden. Die Aktivität vor der 40s-Schultereinheit erwies sich als RNase-sensibel (s. Abb. 27). Zum leichten Ende des Gradienten hin befindet sich steil ansteigende Radioaktivität, die durch RNase abgebauten m-RNS-Molekülen zugeschrieben wird.

Abb. 27 3 Tiere mit je 100 uci (^3H)-Uridin markiert; Laufzeit 60 Min.; 5,5 mg Polysomen in Puffer D gelöst und mit 10 mM Puromycin und 0,6 μg Ribonuklease A inkubiert; Analyse im 7 - 40%igen linearen Saccharosegradienten; SW27, 27.000 Upm, 7 Std., 20 Min., 20° C.

3.13 Test auf poly-A-Sequenzen

Ribonukleinsäuren wurden, wie oben beschrieben, aus Polysomen isoliert und mit (^3H)-poly-Uridylat inkubiert und das Hybridisierungsprodukt im Sedimentationstest, wie unter 2.2.7. beschrieben, verfolgt. 400 gamma RNS wurden mit steigenden Mengen (^3H)-poly-U inkubiert und im 7 - 40%igen Saccharosegradienten 16 Stunden lang bei 2° C. im SW27-Rotor bei 27.000 Upm zentrifugiert. Wurden 400 gamma RNS mit 40 gamma, 30 gamma, 20 gamma, 10 gamma (^3H)-poly-U gemischt, blieb der wesentliche Teil des (^3H)-poly-U ungebunden an der Spitze des Gradienten liegen. Das gebundene (^3H)-poly-U sedimentierte mit einer angedeuteten bergförmigen Verteilung. Nur am Boden fand sich ein Radioaktivitätspeak. (s. Abb. 28, 29, 30, 31, 32, 33).

Abb. 28 400 gamma rNS aus Epidermispoly-
somen wurden mit 40 gamma (^3H)-
poly-U inkubiert; Analyse im 7 -
40%igen linearen Saccharosegradien-
ten; 5027, 27.000 Upr, 10 Std.,
60°C.

Abb. 29 400 gamma rNS aus Epidermispoly-
somen wurden mit 30 gamma (^3H)-
poly-U inkubiert.

Abb. 30 400 gamma rNS aus Epidermispoly-
somen wurden mit 20 gamma (^3H)-
poly-U inkubiert.

Abb. 31 400 gamma rNS aus Epidermispoly-
somen wurden mit 10 gamma (^3H)-
poly-U inkubiert.

Abb. 32 10 gamma (^3H)-poly-U wurden auf
7 - 40%igen linearen Saccharose-
gradienten analysiert.

Abb. 33 Abbildung 28 - 32 übereinander
projeziert.

Wurden 400 gamma rNS mit 4 gamma und 3 gamma
(^3H)-poly-U gemixt, lag scheinbar noch un-
gebundenes (^3H)-poly-U an der Gradienten-
spitze. Das Hybridisierungsprofil im Dichte-
gradienten zeigte eine m-rNS-ähnliche Ver-
teilung. Zwischen 30s und 40s war ein deut-
licher radioaktivitätspeak sichtbar.

Abb. 34 400 gamma RNS aus Epidermispoly-
somen wurden mit 4 gamma (^3H)-poly-
U inkubiert.

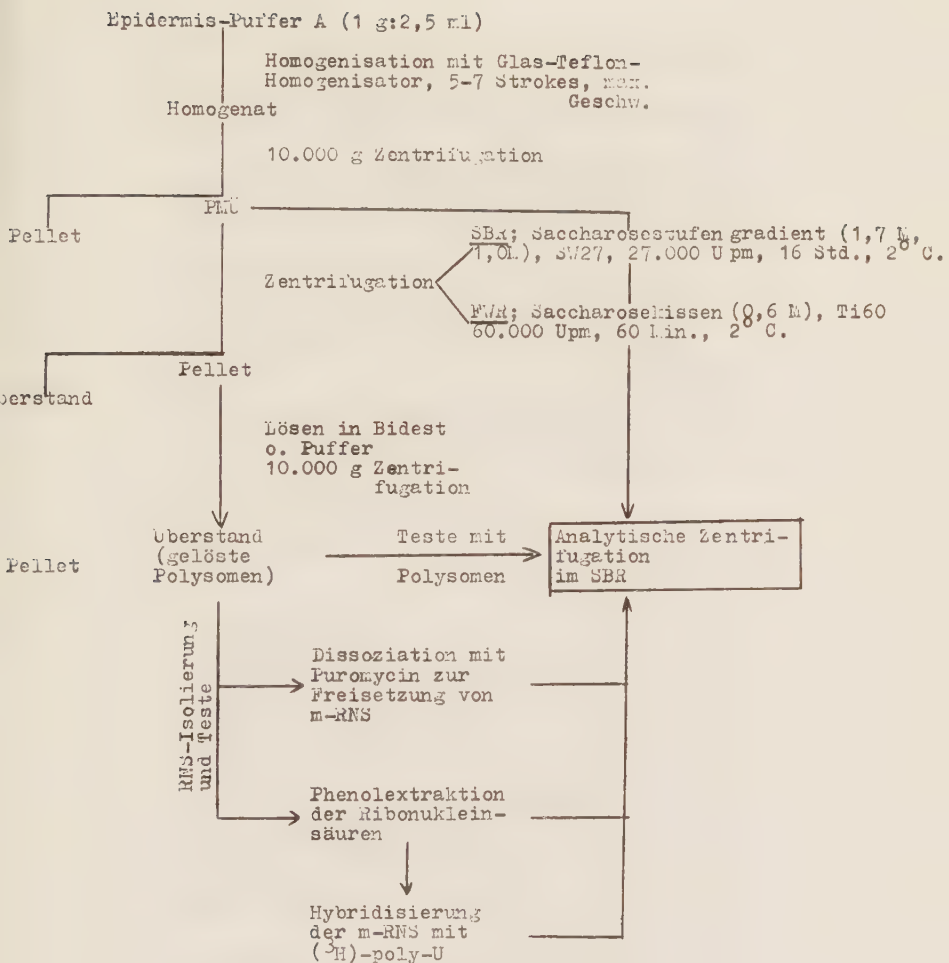
Abb. 35 400 gamma RNS aus Epidermispoly-
somen wurden mit 3 gamma (^3H)-poly-
U inkubiert.

Die Hybridisierungsteste mit 2 gamma und
1 gamma (^3H)-poly-U zeigen, daß hier die
kritische Menge an (^3H)-poly-U unterschrit-
ten wurde. (^3H)-poly-U scheint vollständig
gebunden zu sein. Das Radioaktivitätspro-
fil ist tiefer in den Gradienten eingewan-
dert.

Abb. 36 400 gamma RNS wurden mit 2 gamma
(^3H)-poly-U inkubiert.

Abb. 37 400 gamma RNS wurden mit 1 gamma
(^3H)-poly-U inkubiert.

Abb. 38 Abb. 34 - 37 übereinander projiziert.



4. DISKUSSION

4.1. Polysomenisolierung und Polysomenanalyse

Für die Darstellung von Polysomen aus Epidermiszellen des Meerschweins wurden zwei grundsätzlich verschiedene Methoden benutzt.

1. Die Auftrennung von PMÜ, hergestellt aus Epidermishomogenat durch eine 10.000 g Zentrifugation im linearen Rohrzuckergradienten
2. Die Präparation von Polysomen aus dem 10.000 g Überstand durch Zentrifugation durch ein Rohrzuckerkissen im Schwingbecherrotor oder im Festwinkelrotor. Darauf folgte die Analyse der Polysomen im linearen Dichtegradienten

Die Auftrennung von PMÜ aus Meerschweinepidermis zeigte vorzugsweise Monoribosomen, bei alten Meerschweinen nur eine polysomale Schulter, bei jungen Meerschweinen drei polysomale Peaks (s. Abb. 1 - 2). Das Vorherrschen von Monoribosomen wurde auf die hohe Konzentration von Nukleasen in den Epidermiszellen zurückgeführt (25, 27, 35, 40). Die Ribonukleasekonzentration soll auch mit dem Alter zunehmen (70).

Da die Aktivität der mNasen durch Detergenzien, Bentonit, Rattenleber-mNase-Inhibitoren und Polyvinylsulfat nicht gehemmt wird (40), und auch die Aufarbeitung der Epidermis junger Tiere keine befriedigende Polysomen-

ausbeute erbrachte (70), wurde eine andere Methode der Polysomengewinnung, nämlich ihre Trennung vom RNasehaltigen PMÜ mittels Zentrifugation durch ein Rohrzuckerkissen gewählt (22, 61). Polysomenpräparationen und -analysen aus bereits gut untersuchten Organen wie Leber und Lymphknoten dienten als methodische Kontrolle. Die Präparation von Polysomen aus Leberzellen erbrachte das bekannte bergförmige Polysomenprofil neben einem kleinen Ribosomenpeak (22). Die Präparation aus Lymphknoten zeigte deutlich differenzierte Polysomenpeaks (5, 39), aber einen prävalierenden Monosomenpeak, eine Auftrennung, ähnlich der aus Epidermis.

Der hohe Anteil an Monoribosomen aus Epidermis wird an sich auf die Wirkung einer sauren Ribonuklease zurückgeführt, die bei der Homogenisation freigesetzt wird bzw. auch aus den Talgdrüsen stammen könnte, in denen sie in hoher Konzentration vorliegt (6, 26, 27, 70). Es handelt sich aber offenbar nicht um Abbauprodukte, da "eingefrorene Polysomenprofile" durch Cycloheximidbehandlung genauso aussahen (35). Als weiteres Argument ließe sich die Beobachtung anführen, daß der Monosomenanteil in Geweben mit hoher Mitoserate ca. 75 % beträgt (12). In der Tat ist die Epidermis ein klassisches Beispiel für ein Mausergewebe, d. h. für ein Gewebe mit ständiger relativ hoher Regenerationsrate.

Ein möglicher degradierender Einfluß auf die Polysomen durch das 50 - 60° C. warme Wachs

wird negiert (70), obwohl er bei Einsatz dieser Polysomen im zellfreien Proteinbiosynthesystem erörtert wurde (25). Die Mg^{++} -Konzentration im Lösungspuffer scheint nach unseren Ergebnissen der limitierende Faktor für die Ausbeute von Polysomen aus Epidermiszellen zu sein, wie auch andere Autoren bestätigten (35). Abnehmende Mg^{++} -Konzentrationen ergaben zwar eine bis 10fache Ausbeute an Ribosomen bzw. deren Untereinheiten, aber die Polysomenausbeute war schon bei einer Konzentration von 2 mM gering und fehlte gänzlich im Mg^{++} -freien Milieu.

Bei Vergleich der Ausbeuten an Ribosomen aus Leber, Lymphknoten und Epidermis, bezogen auf Organfrischgewicht, muß berücksichtigt werden, daß bei der Epidermispräparation stets die verhornten, toten Zellagen mit erfaßt wurden, so daß Epidermiszellen einen ebenso großen Anteil an ribosomalem Material zu besitzen scheinen wie Leberzellen oder Lymphozyten. Ein wesentlicher Teil der Polysomen in Epidermiszellen dürfte an das endoplasmatische Retikulum gebunden vorliegen (1, 6). Um ggf. eine Abtrennung zu erreichen, wurde dem Homogenisationspuffer in der Regel Triton X-100 als nicht-ionisches Detergenz zugesetzt. Dieses Detergenz erlaubte den Wascheffekt einer hohen monovalenten Ionenkonzentration (in unserem Fall 200 mM KCl) und einen alkalischen pH von 8,5, der einen hemmenden Einfluß auf die saure Ribonuklease aus-

übt (33). Polysomenpräparationen der Epidermis ohne Detergenz zeigten ungenügende Ausbeuten, da anscheinend durch anhaftende Retikulumstücke polysomales Material bei 10.000 g in das verworfene Pellet sedimentiert war. Unterschiedliche Triton X-100-Konzentrationen zwischen 0,25 % und 1 % hatten keinen Einfluß auf Ausbeute und Profil der Lymphozytenpräparation (s. Abb. 4, 5, 6).

Als kritischer Beweis für die Anwesenheit von Polysomen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Nachweis der Empfindlichkeit gegenüber geringen Mengen Ribonuklease, da Ribosomenaggregate Polysomenprofile imitieren können, aber Resistenz gegenüber RNasen zeigen (50). In unserem Versuch reichten 0,1 µg Rinderpankreasribonuklease aus, um das polysomale Profil abzudauen (s. Abb. 12, 13).
2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten aus Polysomenpellets bestätigten den Aufbau von Ketten aus 2 - 8 Einheiten (s. Abb. 17, 18).
3. Bei kurzer Laufzeit der Versuchstiere (60 Minuten) nach intradermaler Applikation einer radioaktiven Ribonukleinsäurevorstufe wurde vorzugsweise m-RNS radioetkettiert (Abb. 14). Die Radio-

aktivitätszunahme entsprach der zunehmenden Kettenlänge der Polysomen; im leichten Bereich <80s ist die Aktivität freien m-RNS-Molekülen oder Bruchstücken zugeschrieben worden. Bei gleichen Versuchen mit langer Laufzeit (24 Stunden) ist offenbar wegen einer wesentlich größeren Umsatzrate der m-RNS im wesentlichen r-RNS radioaktiv markiert worden (s. Abb. 15), da jedem optischen Peak auch ein Radioaktivitätspeak entspricht.

4. Die präparierten Polysomen synthetisierten ohne Zugabe einer Matrice Proteine. Die Polysomen sind also aktiv und translatieren mit eigenen Messenger-Ribonukleinsäuren. Diese Tests haben jedoch nur vorläufigen Charakter, da keine Optimierung vorgenommen wurde (s. Abb. 16).

4.2.

Isolierung und Analyse von pulsmarkierter polysomaler m-RNS und r-RNS

Der nach (14) mit Phenol aus isolierten Polysomen extrahierbare RNS-Anteil zeigte bei 12 Untersuchungen zwischen 21 % und 25 % der originalen optischen Dichte bei 260 nm.

Bei der Analyse von RNS ergab ein Saccharosegradient von 7 - 40 % bei einer Zentrifugation im SW27 mit 27.000 Upm über 16 Stunden eine adäquate Trennung. Anhand der Transmission bei 252 nm wurden 3 Peaks gefunden, die im

Vergleich mit Literaturangaben (36, 69) der bekannten Zusammensetzung von Eukaryontenribosomen aus 28s-, 18s- und 5s-r-RNS entsprachen. Der 28s-Peak wies stets eine Schulter am schweren Schenkel auf, und die 18s-RNS zeigte sich stets doppelgipflig. Ob es sich dabei um eine Eigentümlichkeit epidermaler r-RNS oder um Artefakte handelt, wurde nicht sicher geklärt.

Durch intensivere Phenolisierung konnte ausgeschlossen werden, daß restliche Proteine das Sedimentationsverhalten der RNS verändern. Auch eine Degradierung der RNS während der Enteiweißung und Alkoholfällung ist nicht auszuschließen, doch sollte das RNS-Material dann leichter und nicht schwerer erwartet werden. Auch sind Interaktionen der RNS-Moleküle mit Polysacchariden möglich, und das RNS-Material kann während der Extraktion und Analyse Aggregate gebildet haben.

Markierungsstudien mit (^3H)-Adenin zeigten je nach Laufzeit der Tiere eine unterschiedliche Präferenz der Inkorporierung in die verschiedenen RNS-Klassen.

Lange Laufzeiten (24 Stunden) führen zu einer nahezu ausschließlichen Markierung ribosomaler RNS, wobei auch die Schulter am 28s-Peak entsprechend der Transmission bei 260 nm sowie weniger deutlich der Doppelgipfel des 18s-Peaks radiomarkiert war. Es scheint sich demnach jeweils um ribosomale RNS zu handeln. Kürzere Laufzeiten zeigten eine sukzessiv abnehmende Radioetikettierung der r-RNS, aber eine zunehmende der m-RNS. Bei Pulsmarkierungen

mit Leberzellen teilte sich die gefundene Radioaktivität nach 2 - 3 Stunden gleichermaßen zwischen m-RNS und r-RNS auf (51). Offenbar ähnliche Befunde fanden sich bei den vorgelegten Untersuchungen. Aus den (^3H)-Adenin-Markierungs-Studien mit Laufzeiten von 25 (Abb. 19), 60 (Abb. 20) und 120 Minuten (Abb. 21) kann geschlossen werden, daß sich schnell markierende RNS zwischen 2 Peaks im Bereich von 28 - 40s und 4 - 10s heterodispers über den Gradienten verteilt. Der 28 - 40s-Peak weist die größte Radiomarkierung bei der kürzesten Laufzeit auf, umgekehrt der 4 - 10s-Peak die größte bei einer Laufzeit von 120 Minuten. Wenn es sich jeweils um markierte m-RNS handelt, dann allerdings mit unterschiedlichen Umsatzraten. Andere Autoren fanden in 18 - 20 Minuten nach (^3H)-Uridin-Applikation lediglich eine Radiomarkierung der m-RNS (52, 55, 59).

m-RNS-Moleküle, die nur in einem engen Bereich sedimentieren, sind aus Retikulozyten und den Glandulae posteriores der Seidenraupe isoliert worden. Der Hämoglobinmessenger der Retikulozyten sedimentiert bei 9s - 10s (49, 72), der Fibroinmessenger der Seidenraupe sedimentiert bei 32s (16, 71).

Bei dem 28 - 40s-Peak könnte es sich allerdings auch um m-RNS-Präkursor-Moleküle handeln, die aus dem Cytoplasma mitisoliert wurden (36). Bis 30 % nicht polysomengebundene m-RNS soll im Cytoplasma vorkommen (38).

Nach Dissoziation von anhaftenden Proteinen sedimentiert sie wie polysomale m-RNS (42). Auch bei der Aufarbeitung und Sedimentation durch ein Saccharosekissen (1,7 M) könnte Präkursor-m-RNS bei Sedimentationskoeffizienten von 40 - 100s mit den Polysomen pelletiert sein (21, 38). Nach Phenolextraktion sind die Sedimentationseigenschaften dieser Moleküle mit denen polysomaler m-RNS identisch, sodaß dadurch eine Unterscheidung nicht möglich ist. Auch r-RNS-Präkursoren können nicht ausgeschlossen werden. Ferner ist zu erwägen, ob die RNS schwerer als 28s nicht bei der Homogenisation artifiziell aus Zellkernen freigesetzt wurde. Die von uns gefundenen Radiomarkierungsdaten würden nicht unbedingt dagegen sprechen. Andere Untersucher (56) fanden 20 Minuten nach Pulsmarkierung 94 % der radioaktiven RNS in der Kernfraktion und eine Abhängigkeit der Kontamination cytoplasmatischer m-RNS mit Kern-RNS von der Intensität der Homogenisation. Poly-A-Kinetik-Studien ergaben eine Verweildauer der Präkursor-m-RNS im Kern von 20 Minuten (55). Die Kern- bzw. Hn-RNS zeigt Sedimentationskoeffizienten von 40s - 100s (21, 38). Bei Kontaminierung mit Hn-RNS sollten diese Moleküle vom Ende des Gradienten bis 30s sedimentieren und sich nicht in einem so scharfen Peak darstellen.

4.3 Test der m-RNS auf poly-A-Sequenzen

Zur Prüfung von m-RNS auf poly-A-Sequenzen wurden zahlreiche Techniken entwickelt, die auf Hybridisierung mit poly-U resp. poly-dT-Materialien und Adsorption an Millipore-Filtern (3, 14, 22, 23, 43, 48) beruhen. Wir benutzten zur Aufspürung von poly-A-Sequenzen eine Hybridisierungstechnik (24, 41) mit radiomarkiertem poly-U, die sogar quantitative Aussagen, sozusagen "eine Titration der poly-A-Sequenzen mit poly-U" zulassen soll. (24). Für eine optimale Hybridisierung ist auf einen geringen poly-U-Überschuß zu achten, da bei einem Unterangebot Vernetzungseffekte, d.h. Bindungen eines poly-U-Moleküls mit mehr als einem RNS-Molekül auftreten.

Die aus Polysomenpellets nach (14) gewonnene RNS wurde jeweils zu 400 gamma in Relationen von 10:1 bis 400:1 mit (^3H)-poly-U versetzt, wobei der eigentliche m-RNS-Anteil 1 - 5 % der eingesetzten RNS-Menge betragen haben dürfte.

Bei Relationen von 10:1 bis 40:1 liegt poly-U offenbar in hohem Überschuß vor (Abb. 28-31), kenntlich am großen Radioaktivitätsgipfel im leichten Bereich des Gradienten, der allerdings nicht ganz wie "reines" poly-U (Abb. 32) sedimentiert, was u.a. auf Nuklease-Einwirkung zurückgeführt werden könnte. Erst bei niedrigerem poly-U-Angebot stellen sich aus dem Radioaktivitäts-Plateau des schweren Gradiententeils ein Peak (20s) und eine berg-

förmige Verteilung im mittleren Bereich heraus, die der hier jeweils gefundenen m-RNS zu entsprechen scheinen (Abb. 19-21).

Die Übereinstimmung der Radioaktivitäts-Verteilung bei den Hybridisierungs- und Pulsmarkierungsversuchen läßt vermuten, daß der zwischen 3s und 10s sedimentierende Peak ersterer nicht nur unverbrauchtes poly-U, sondern auch ebenfalls "leichte" m-RNS wie bei den letzteren repräsentiert.

Im Vergleich zu anderen Analysen (24) scheinen die Relationen 1:100 bzw. 1:133 (entsprechend 3 resp. 4 gamma (^3H)-poly-U) die kritische Mindestkonzentration darzustellen, bei der ein Molekül m-RNS mit poly-A ein Molekül poly-U bindet (Abb. 34, 35).

Bei noch niedrigeren poly-U-Konzentrationen von 200:1 und 400:1 (entsprechend 1 und 2 gamma (^3H)-poly-U) treten offenbar die oben erwähnten Netzeffekte auf, da das hybridisierte Material tiefer in den Gradienten eingewandert ist (Abb. 36, 37).

Die Tatsache, daß ein Teil (ca. 1 %) der von uns gewonnenen RNS mit poly-U hybridisierte, läßt auf poly-A-Sequenzen derselben schließen, die ein sicheres Kriterium für das Vorliegen von m-RNS sein sollen (13), da sie in r-RNS und t-RNS nicht enthalten sind.

4.4

Dissoziation von Polysomen in Untereinheiten zur Freisetzung von m-RNS

Polysomen lassen sich durch Behandlung mit kritischen Konzentrationen an monovalenten- und divalenten Ionen und Puromycin in aktive Untereinheiten zerlegen (8, 9, 10). Dabei wird nackte m-RNS und t-RNS freigesetzt. Diese Methode bietet eine Alternative zur 40S-Isolierung mit Phenol, da nicht die gesamte RNS des Cytoplasmas isoliert wird, sondern nur m-RNS und t-RNS neben Ribonukleoproteinen, während die r-RNS in unversehrten Untereinheiten eingeschlossen bleibt.

Durch hohe monovalente Ionenkonzentration allein konnten die Polysomen nicht ausreichend in Untereinheiten zerlegt werden (s. Abb. 23), bei zusätzlicher Behandlung mit Puromycin erfolgte nahezu vollständige Dissoziation in 40s- und 60s-Untereinheiten (Abb. 24).

Analoge Versuche nach vorheriger Pulsmarkierung der Epidermis in vivo mit (^3H)-Uridin bei Laufzeiten von 60 (Abb. 25) bzw. 120 Min. (Abb. 26) zeigen Radioaktivitätsspeaks entsprechend dem optischen Profil der 60s- und 40s-Untereinheiten, die offenbar hauptsächlich markierte r-RNS repräsentieren und aufgrund des langsameren Umsatzes derselben stärker in letzterem Fall radioetikiert waren. Im leichteren Teil des Gradienten bis 40s findet sich eine heterodisperse Radioaktivitätsverteilung, die m-RNS repräsentieren dürfte, da markierte kleinemolekulare t-RNS sicherlich überhaupt nicht in

den Gradienten eingewandert sein dürfte. Die Annahme, markierte m-RNS freigesetzt zu haben, wird weiterhin dadurch unterstützt, daß die fragliche Radioaktivität im leichten Teil des Gradienten nach RNase-Einwirkung gemäß ihrer im Gegensatz zur Resistenz der Untereinheiten diesbezüglichen Empfindlichkeit verschwindet, und zwar offenbar zugunsten noch leichter Abbauprodukte (Abb. 24). Man hat sogar den Eindruck, daß auch im schweren Abschnitt des Gradienten markierte, RNase-empfindliche RNA vorgelegen hat, da nach Einwirkung der Nuklease die radioaktiven Peaks der Untereinheiten wie herauspräpariert erscheinen. Dabei dürfte es sich um Protein-gebundene m-RNS gehandelt haben (53, 54, 68, 57, 58).

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus der Epidermis des Meerschweins ließen sich durch rasche Aufarbeitung des Homogenats Polysomen - Monosomen isolieren. Die Anwesenheit eines Detergenz im Homogenisationspuffer und die Konzentration von Mg^{++} -Ionen im Polysomenlösungspuffer beeinflussten die Ausbeute an ribosomalem Material wesentlich. Die isolierten Polysomen zeigten sich im zellfreien Proteinbiosynthesystem aktiv.

Aus Polysomen - Monosomen von Meerschwein-epidermis wurden m-RNS und r-RNS isoliert. Durch Radioetikettierungen mit unterschiedlichen Laufzeiten konnten sich schnell markierende Ribonukleinsäuren gezeigt werden, die im wesentlichen aus 3 Fraktionen mit unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften und unterschiedlichen Umsatzraten bestanden. Die erste Fraktion sedimentierte peakförmig zwischen 30 und 40s, die zweite heterodispers zwischen 28 und 10s und die dritte wieder als Peak zwischen 4s und 10s. Die Umsatzraten nahmen in gleicher Reihenfolge ab. Alle drei Fraktionen enthielten poly-A-Sequenzen.

Bei der Annahme, daß es sich bei diesem Material um m-RNS handelt, muß die Möglichkeit eingeräumt werden, daß Präkursoren der rNS, Aggregatbildungen der rNS, Interaktionen mit Polysacchariden die Ergebnisse beeinflusst haben.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Arcyris, Nevar, Mueller, De Yong, Gordon,
J. Invest. Derm., 63, 262 - 267 (1974)
- 2) Arlinghaus, Ascione, Methods in Molecular Biology,
Vol. II, Decker Inc. New York (1972)
- 3) Aviv, Leder, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, No. 6,
1408 - 1412 (1972)
- 4) Baden, Gifford, Goldsmith, J. Invest. Derm., 56,
446 - 449 (1971)
- 5) Becker, Rich, Nature, 212, 142 - 146 (1966)
- 6) Bernstein, J.Soc.Cosmet.Chem., 21, 583 - 594 (1970)
- 7) Bernstein, Chakrabarti, Kumaroo, Sibrack, J. Invest.
Derm., 55, 291 - 302 (1970)
- 8) Blobel, Proc.Nat.Acad.Sci. USA, Vol. 68, 4, 832 - 835
(1971)
- 9) Blobel, Proc.Nat.Acad.Sci. USA, Vol. 68, 8,
1881 - 1885 (1971)
- 10) Blobel, Sabatini, Proc.Nat.Acad.Sci. USA, Vol. 68,
2, 390 - 394 (1971)
- 11) Bloemendal, Frontiers of Biology, Vol. 27, 487 - 514,
1972, North-Holland Research Monographs,
North-Holland Publishing Company, Amsterdam - London
- 12) Bloemendal, Benedetti, Bont, Methods in Enzymology,
Vol. XXX, (32), 313 - 327 (1974) Acad. Press,
New York, London

- 13) Brawerman, Methods in Enzymology, Vol. XXX, (56), 605-612 (1974), Acad.Press, New York, London
- 14) Brawerman, Mendecki, Lee, Biochemistry, Vol. 11, 4, 637-641 (1972)
- 15) Britten, Roberts, Science N.Y., 131, 32 (1960)
- 16) Brown, Suzuki, Methods in Enzymology, Vol. XXX, Part F, 648-656 (1974), Acad.Press, New York, London
- 17) Chakrabarti, Bernstein, Abstr.Amer.Chem.Soc., N.Y. (1966)
- 18) Chakrabarti, Bernstein, Fed.Proc., 26, 369 (1967)
- 19) Crounse, Nature (Lond.), 200, 539-542 (1963)
- 20) Crounse, in Montagna, W. and W.C. Lobitz, Jr.: "The epidermis", Acad.Press (1964)
- 21) Edmonds, Vaughan, Nakazato, Proc.Nat.Acad.Sci.Wash. 68, 1336 (1971)
- 22) Falvey, Staehelin, J.Mol.Biol., 53, 1-19 (1970)
- 23) Faust, Diggelmann, Mach, Biochemistry, 12, No. 5, 924-931 (1973)
- 24) Fraser, Loening, Eur.J.Biochem., 34, 153-158 (1973)
- 25) Freedberg, Biochim.Biophys.Acta., 224, 219 (1970)
- 26) Freedberg, J.Invest.Derm., 54, 2. 108-120 (1970)
- 27) Freedberg, Fine, Cordelle, J.Invest.Derm., 48, 55 (1967)

- 28) Fukuyama, Nakamura, Bernstein, Anat.Rec., 152,
525-536 (1965)
- 29) Fukuyama, Epstein, J.Invest.Derm., 47, 551-560 (1966)
- 30) Fukuyama, Epstein, J.Invest.Derm., 49, , 595 (1967)
- 31) Fukuyama, Buxman, Epstein, J.Invest.Derm., 51,
355-364 (1968)
- 32) Fukuyama, Epstein, J.Cell.Biol., 40, 830-838 (1969)
- 33) Gielkens, Berns, Bloemendal, Eur.J.Biochem., 22,
478-484 (1971)
- 34) Gillespie, Darskus, Vortrag XIV, Int.Congr.Derm.,
Padua-Venedig (1972)
- 35) Gilmartin, Freedberg, J.Invest.Derm.64, 2. 90-95
(1975)
- 36) Henshaw, J.Mol.Biol., 36, 401-411 (1968)
- 37) Heywood, Rich, Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 59, 590-597,
(1968)
- 38) Jelinek, Adesnik, Salditt, Sheiness, Wall, Molloy,
Philipson, Darnell, J.Mol.Biol., 75, 515-532 (1973)
- 39) Kay, Ahern, Atkins, Biochim.Biophys.Acta, 247,
322-334 (1971)
- 40) Kumaroo, Gray, Kaman, Bernstein, J.Invest.Derm.,
59, 4, 305-312 (1972)
- 41) Kwan, Brawerman, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 69, No. 11,
3247-3250 (1972)
- 42) Lee, Krsmanovic, Brawerman, Biochemistry, Vol. 10,
5, 895-900 (1971)

- 43) Lee, Mendecki, Brawerman, Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 68, 1331 (1971)
- 44) Lockard, Lingrel, Biochem.Biophys.Res.Comm., 37, 204 (1969)
- 45) Mathews, Korner, Eur.J.Biochem., 17, 339 (1970b)
- 46) Matoltsy, A.G. + M.N., J.Invest.Derm., 46, 127-129 (1966)
- 47) Moldave, Frontiers of Biology, Vol. 27, 465-486 (1972), North-Holland Research Monographs, North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London
- 48) Nakazato, Edmonds, J.Biol.Chem., 247, 3365-3367 (1972)
- 49) Nienhuis, Falvey, Anderson, Methods in Enzymology, Vol. XXX, Part F, 621 - 630 (1974), Acad.Press, New York, London
- 50) Noll, Techniques in Proteinbiosynthesis, Vol. 2, Eds. P.Campbell and J.Sargent. Acad.Press, New York (1968)
- 51) Noll, Stutz, Methods in Enzymology, Vol. XII, Part B, 129-154 (1968), Acad.Press, New York, London
- 52) Penman, S. + M., J.Mol.Biol., 34, 49-69 (1968)
- 53) Perry, Kelly, J.Mol.Biol., 16, 255 - 268 (1966)
- 54) Perry, Kelly, J.Mol.Biol., 35, 37-59, (1968)
- 55) Perry, Kelly, La Torre, J.Mol.Biol., 82, 315-331 (1974)
- 56) Plagemann, Biochim.Biophys.Acta, 182, 46-56 (1969)
- 57) Rothberg, J.Invest.Derm., 34, 197-206 (1960)

- 58) Rothberg, Crounse, Davis, Avogardo, Lamas,
J.Invest.Derm., 44, 320-325 (1965)
- 59) Schochetman, Perry, J.Mol.Biol., 63, 591-596
(1972b)
- 60) Schoenmakers, Zweers, Bloemendal, Biochim.Biophys.
Acta, 145, 120-126 (1967)
- 61) Schreier, Staehelin, J.Mol.Biol., 73, 329-349 (1973)
- 62) Schulz-Harder, Dissertation, F.U.Berlin (1975)
- 63) Schulz-Harder, Diplomarbeit, F.U. Berlin (1973)
- 64) Schwarz, Witzke, Jacob, Pech, Arch.Derm.Forsch., 240,
173-183 (1971)
- 65) Schwarz, Zschr.Haut-Geschl.Krkh., 42, 20, 791-806
(1967)
- 66) Van Scott, J.Invest.Derm., 16, 377-379 (1952)
- 67) Sheldon, Jurale, Kates, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 69,
No. 2, 417-421 (1972)
- 68) Spirin, Frontiers of Biology, Vol. 27, 515-537 (1972),
North-Holland, Research Monographs, North-Holland
Publishing Company, Amsterdam-London
- 69) staehelin, Wettstein, Oura, Noll, Nature, 201, 264
(1964)
- 70) Steinert, Rodgers, Biochim.Biophys.Acta, 232,
556-572 (1971)
- 71) Suzuki, Brown, J.Mol.Biol., 63, 409-429 (1972)
- 72) Williamson, Morrison, Lanyon, Eason, Paul, Biochemistry,
Vol. 10, No. 4, 16, 3014-3021 (1971)

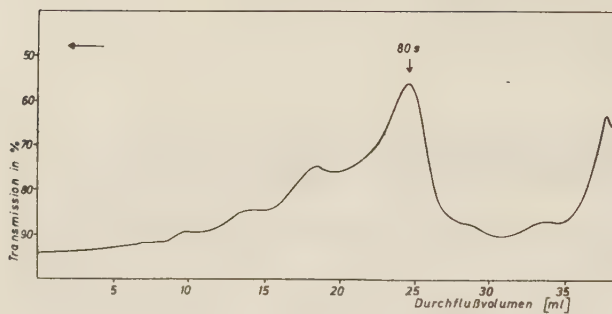


Abb. 1

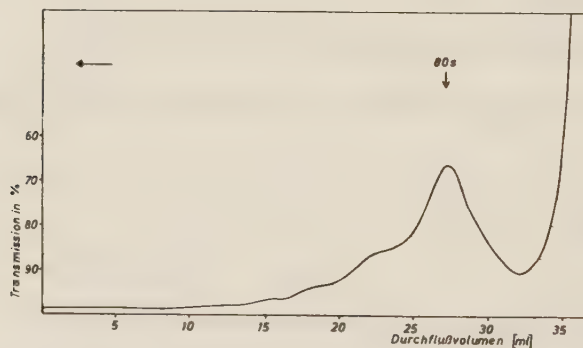


Abb. 2

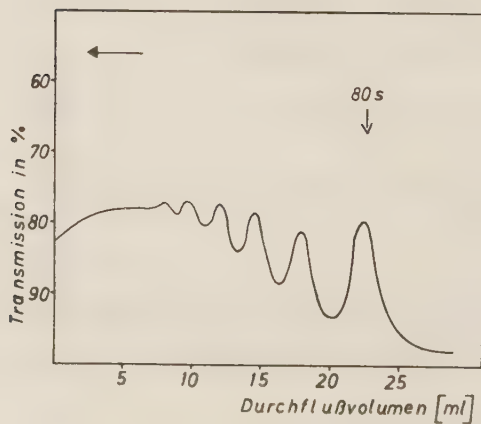


Abb. 3

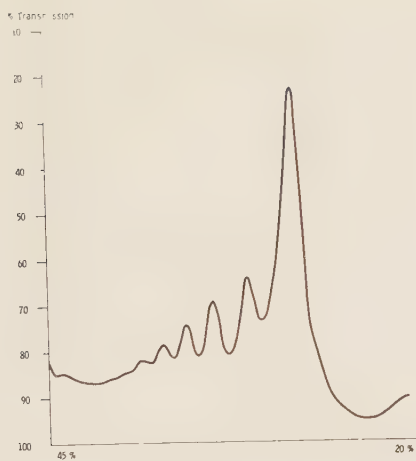


Abb. 4

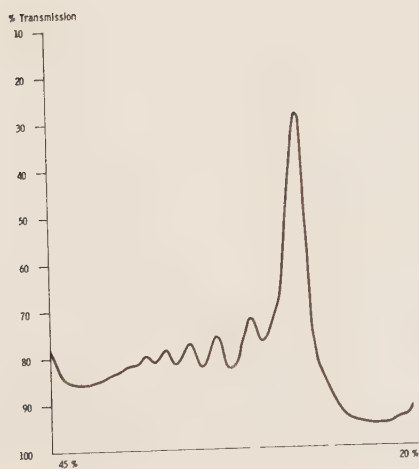


Abb. 5

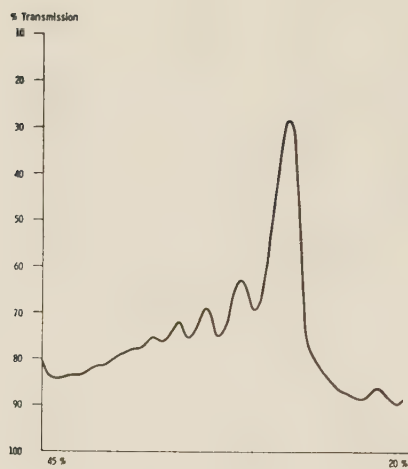


Abb. 6

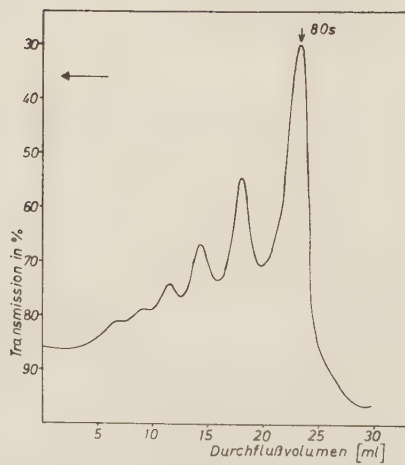


Abb. 7

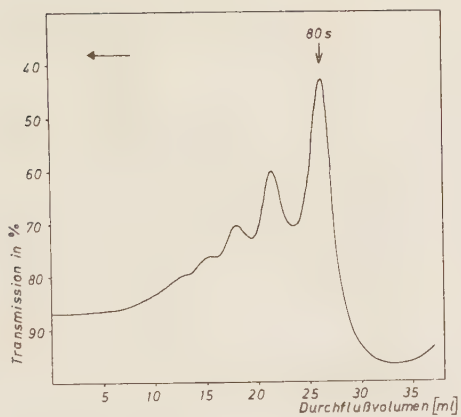


Abb. 8

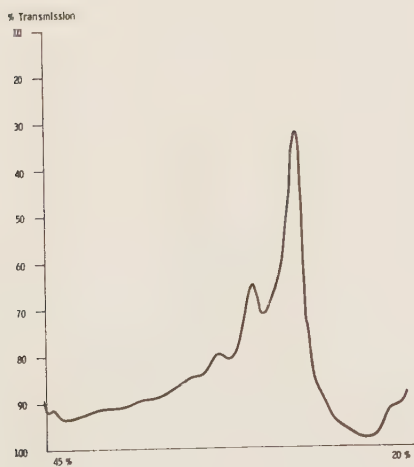


Abb. 9

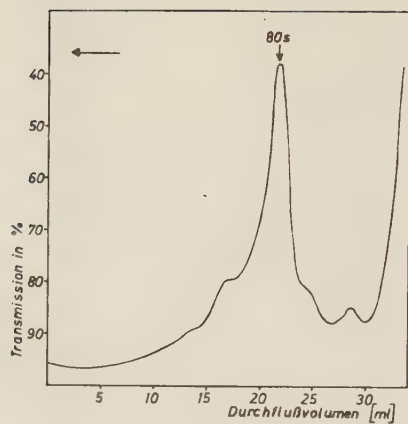


Abb. 10

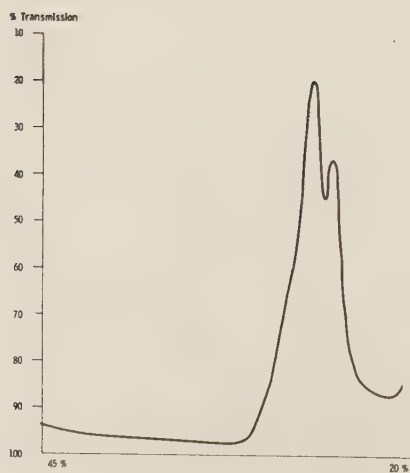


Abb. 11

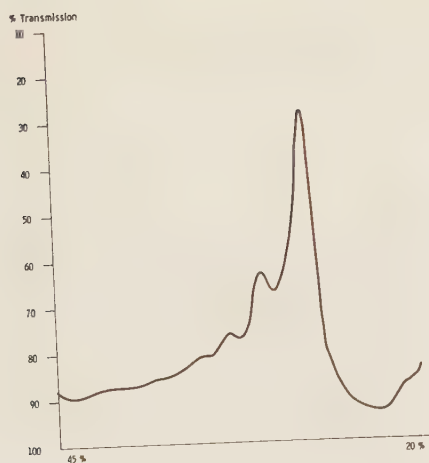


Abb. 12

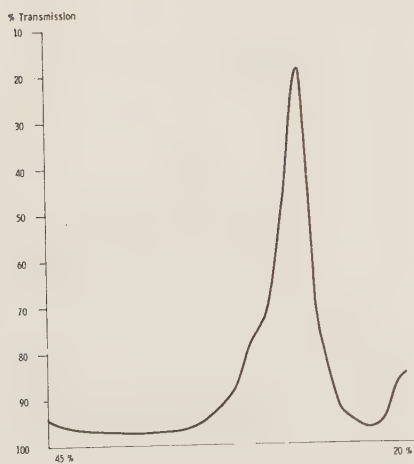
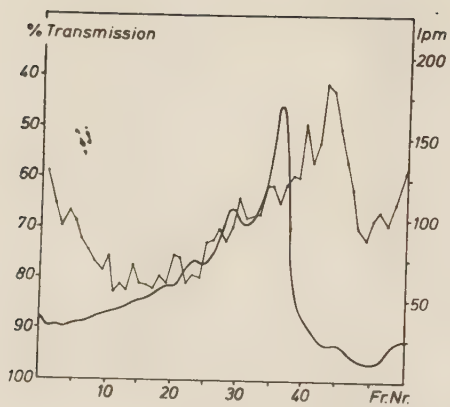


Abb. 13



2. 14

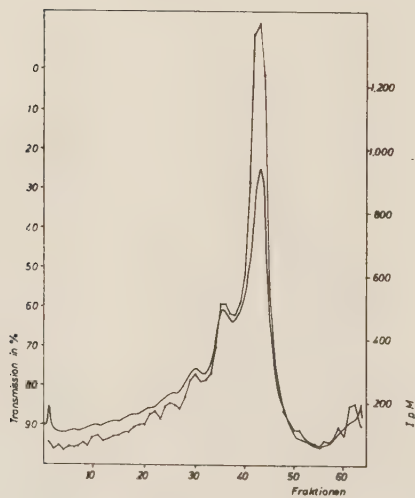


Abb. 15

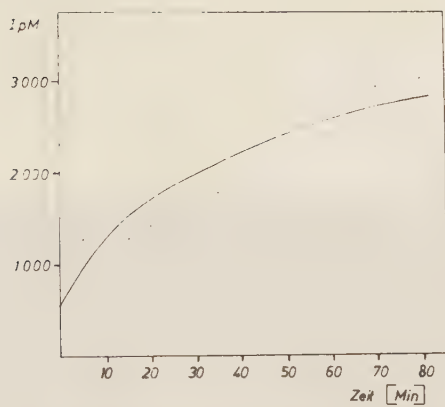


Abb. 16

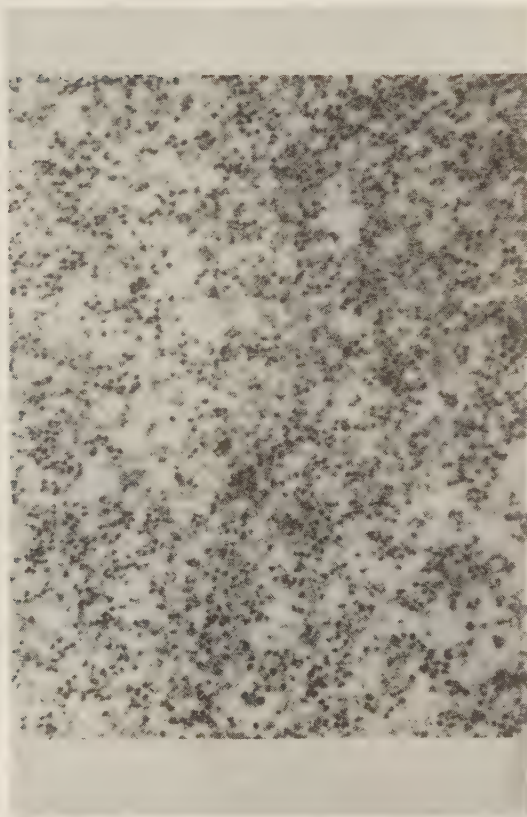


Abb. 17



Abb. 18

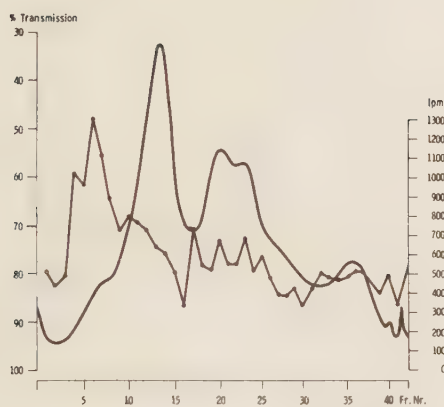


Abb. 19

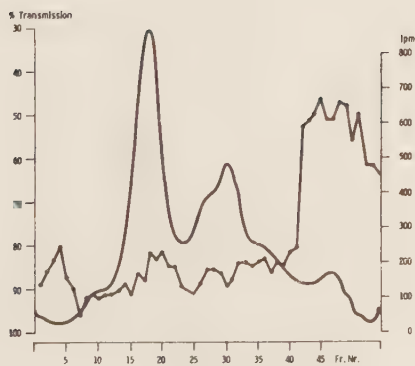


Abb. 20

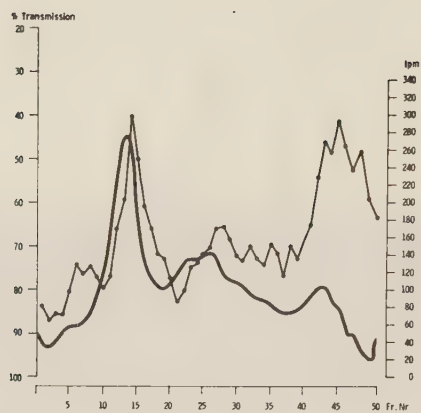


Abb. 21

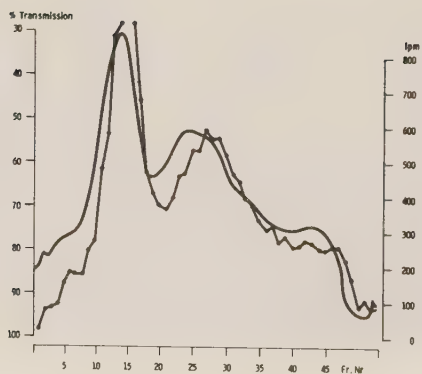


Abb. 22

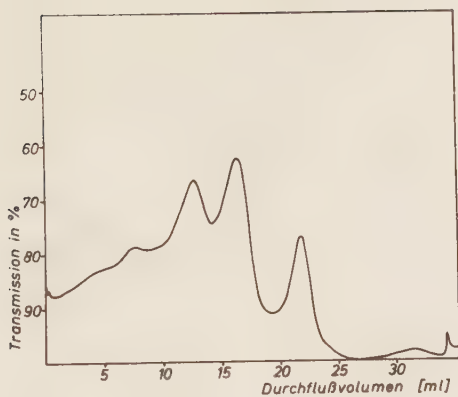


Abb. 23

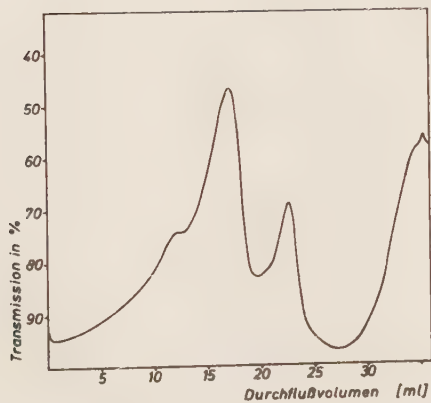


Abb. 24

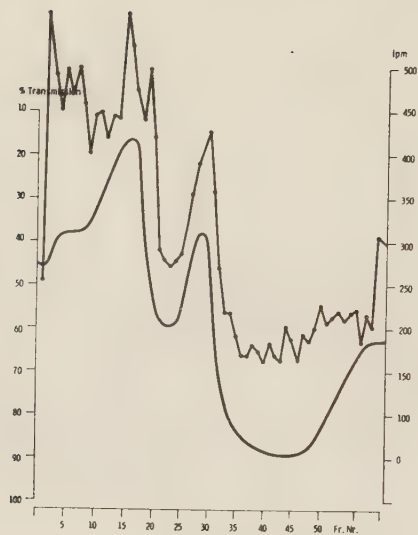
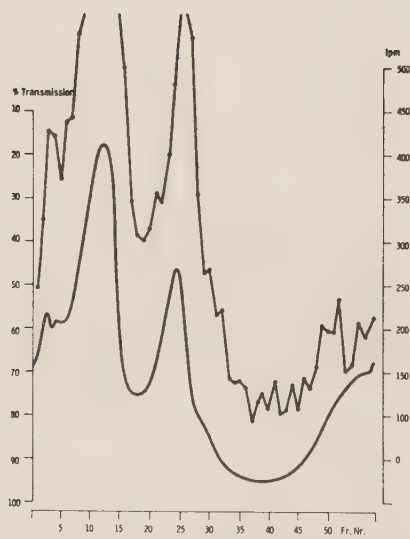


Abb. 25



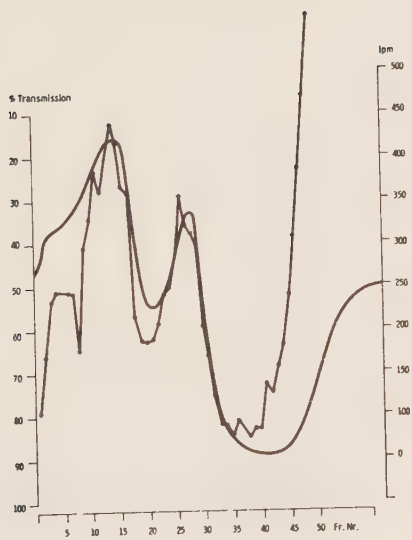


Abb.27.

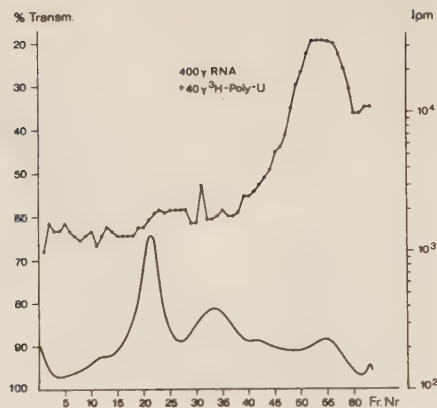


Abb. 28

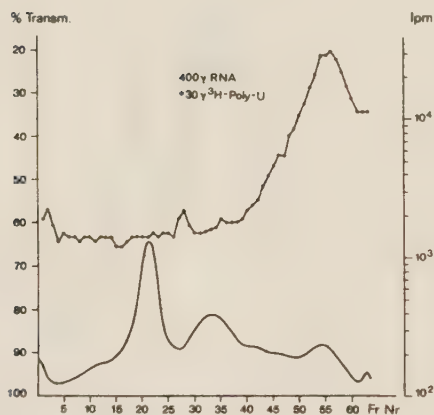


Abb. 29

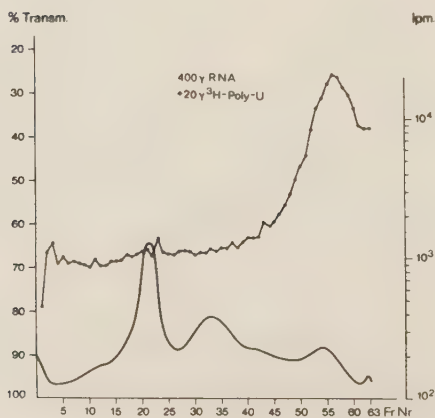


Abb. 30

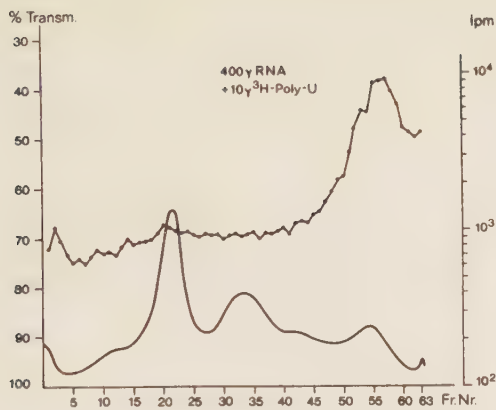


Abb. 31

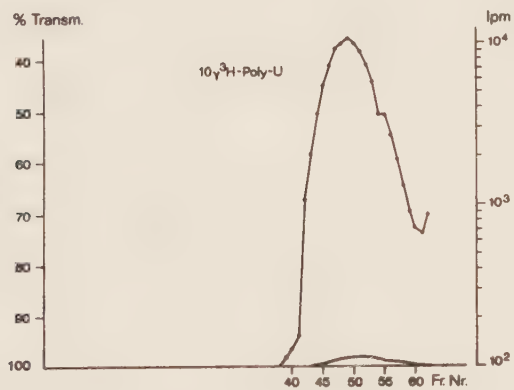


Abb. 32

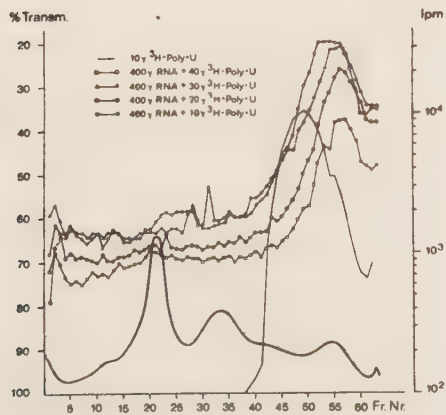


Abb. 33

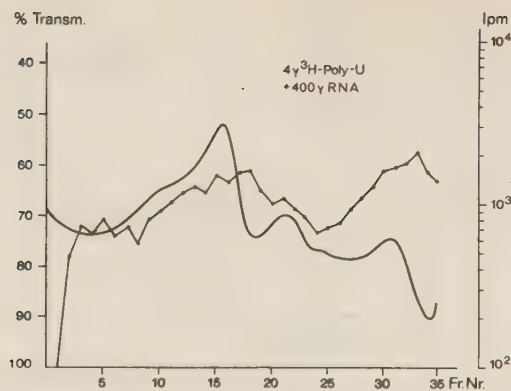


Abb. 34

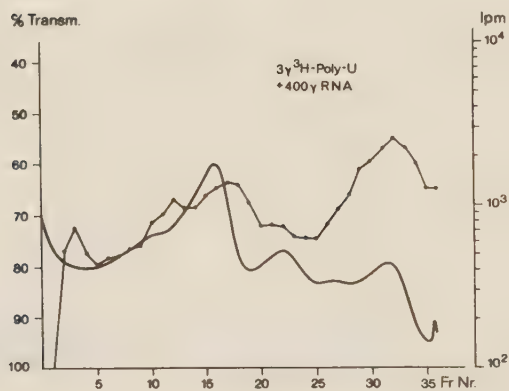


Abb. 35

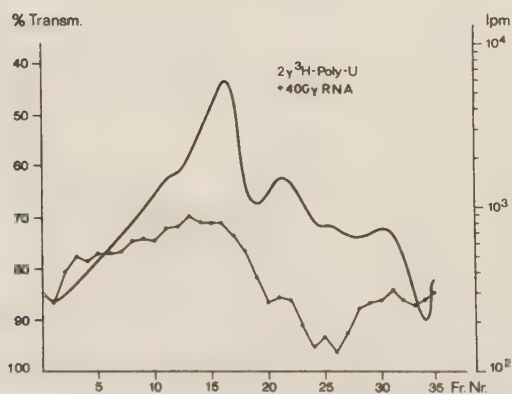


Abb. 36

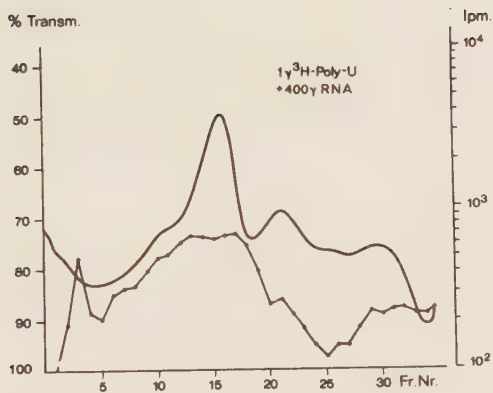


Abb. 37

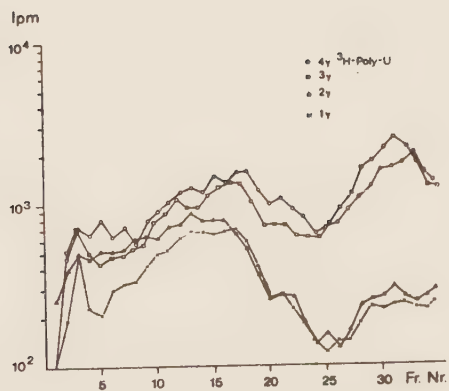


Abb. 38

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. E. Schwarz für die Überlassung des Dissertationsthemas und die hilfreiche Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Ich danke den Mitarbeitern des dermatologischen Forschungslabors im Klinikum Steglitz und der Arbeitsgruppe Molekularbiologie im Hause 5 des Zentralinstituts 5 für Hilfe und Diskussion.

Besonders möchte ich Frau Pech danken, die an der Durchführung dieser Arbeit wesentlich beteiligt war.

Lebenslauf

Name: Reinhard, Axel, Horst Knop

geboren: 4. März 1947 in Berlin-Spandau

Wohnung: 1 Berlin 15, Paulsborner Str. 91

Eltern: Franz Knop geb. 14.2.1909
gest. 17.8.1965
Herta Knop geb. Knop
geb. 28.2.1910

Schul Ausbildung: Grundschule 1953 - 1959
Gymnasium 1959 - 1967
Abitur 1967

Ausbildung: Studium der Humanmedizin
1967 - 1973
an der Freien Universität Berlin
Staatsexamen 1973
Medizinalassistentenzeit
31.10.1973 - 31.5.1974
auf der II. Inneren Abt. des Städt.
Krankenhauses Berlin Spandau-Nord
Promotion 1. 6. 1974 - 31.5.1975
im Dermatologischen Forschungslabor
des Klinikum Steglitz der F.U.Berlin

